第 37 卷第 21 期　　生　态　学　报　　Vol.37,No.21
2017 年 11 月　　ACTA ECOLOGICA SINICA　　Nov.,2017

DOI: 10.5846/stxb201608191696
彭国清,唐绍清.喀斯特耐阴灌木淡黄金花茶的精细空间遗传结构与基因流.生态学报,2017,37(21):7313-7323.
Peng G Q, Tang S Q.Fine-scale spatial genetic structure and gene flow of *Camellia flavida*, a shade-tolerant shrub in karst.Acta Ecologica Sinica,2017,37(21):7313-7323.

喀斯特耐阴灌木淡黄金花茶的精细空间遗传结构与基因流

彭国清,唐绍清*
广西师范大学,生命科学学院,广西珍稀濒危动物生态学重点实验室,桂林　541004

摘要:淡黄金花茶(*Camelia flavida*)是一种具有淡黄色花瓣的金花茶植物,为喀斯特典型的耐阴灌木。基于广西弄岗喀斯特季节性雨林 15 hm^2(300 m × 500 m)监测样地,利用 13 对微卫星(SSR)标记,探讨喀斯特地貌对淡黄金花茶的精细空间遗传结构(SGS)、基因流和小尺度范围遗传分化的影响。结果表明:(1)淡黄金花茶在 50 m 距离内产生显著的 SGS,在灌木类型和依赖种子传播的物种中具有中等程度的 SGS 强度(Sp=0.0248);(2)淡黄金花茶种子和花粉传播平均距离较短,分别为 12.47 m 和 29.03 m,72.2%花粉和 81.0%种子的传播距离均主要是在 20 m 内;(3) 淡黄金花茶在小尺度范围(种群间距离<1 km)的 4 个种群,甚至相距 100 m 的两个斑块产生了显著的遗传分化。喀斯特生境地貌对淡黄金花茶的基因流产生阻碍作用,从而导致淡黄金花茶在小尺度范围产生遗传分化。

关键词: 喀斯特;淡黄金花茶;空间遗传结构;基因流

Fine-scale spatial genetic structure and gene flow of *Camellia flavida*, a shade-tolerant shrub in karst

PENG Guoqing, TANG Shaoqing*
Guangxi Key Laboratory of Rare and Endangered Animal Ecology, College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, *China*

Abstract: *Camellia flavida*, a golden *Camellia* with yellow petals, is a typical shade-tolerant shrub in karst regions. The aim of this study was to explore whether karst habitat heterogeneity contributes to the fine-scale spatial genetic structure (SGS), gene flow, and genetic differentiation of *C. flavida* at the small scale within a 15hm^2 plot of northern tropical karst seasonal rain forest in Nonggang, based on 13 microsatellites. The results indicated that there was a significant SGS in *C. flavida* within a distance of 50 m, the intensity of which is moderate (Sp = 0.0248) among shrub and gravity-dispersed species. The mean seed and pollen dispersal distances of *C. flavida* were short at 12.47 m and 29.03 m, respectively, with 72.2% of pollen and 81.0% of seed being mainly spread within 20 m. In addition, there was significant genetic differentiation among four populations at the small scale (distance between populations < 1 km), and even between two patches separated by a distance of only 100 m. It is concluded that karst habitat heterogeneity significantly influences the gene flow of *C. flavida*, leading to comparatively strong SGS and genetic differentiation at the small scale.

Key Words: karst; *Camellia flavida*; spatial genetic structure; gene flow

基金项目:国家自然科学基金(31260053);广西研究生教育创新计划 (YCSZ2015093);广西珍稀濒危动物生态学重点实验室研究基金(桂科能 15-A-01-08)

收稿日期:2016-08-19;　**网络出版日期**:2017-07-11

*通讯作者 Corresponding author.E-mail: shaoqing@ mailbox.gxnu.edu.cn

中国是世界上喀斯特地貌分布面积最广的国家,占世界岩溶面积的 64%,主要分布在广西、云南、贵州和四川[1]。典型喀斯特地貌广泛分布着峰丛、槽谷、洼地等,小生境复杂多样,群落结构也复杂多变、物种多样性从峰丛至洼地变化剧烈[2]。喀斯特地区生物多样性高,珍稀濒危动植物和地区特有种丰富,显示了喀斯特地区植物区系和生物多样性极其特殊[3]。例如,广西弄岗国家级自然保护区具有典型喀斯特地貌,岩溶特有植物丰富,这种特有化的发展在苦苣苔科和山茶科的金花茶植物尤为显著[5]。生境异质性可导致物种在不同的基岩和土壤条件下其叶形、树皮或者花序等产生形态变化[6],在典型峰丛谷地生态系统中的岩溶区的叶片解剖旱生结构比非岩溶区更明显[7]。

空间遗传结构(spatial genetic structure, SGS)是指种群在二维空间基因型的分布格局,常利用个体之间的亲缘系数与地理距离的关系进行空间自相关分析[8-9]。研究 SGS 有助于了解种群个体间、个体与环境间的相互作用以及种群发展动态,能够为濒危植物的原地和迁地保护提供重要的参考[10-11]。同时,SGS 被认为是决定种群短期进化的一个关键因子[12],现有的 SGS 能够影响附近个体交配,产生的后代的适合度可能不一样,从而对环境异质性的适应不一致[13-14]。SGS 是植物本身特性与生态因素长期相互作用的结果,影响的因素众多而复杂,产生的作用也不相同。一般认为,建立者效应、克隆繁殖、低密度的种子资源、有限的花粉和种子流等增强 SGS[15-17],而广泛的花粉和种子传播、重叠种子区(overlapping seed shadow)、多样的生活史和随机的自疏效应等则减弱 SGS[13,16,18-21]。其中,影响 SGS 的两个主要因素是种子和花粉流,有限的花粉和种子流导致存在 SGS[22-24]。

目前,喀斯特地区植物 SGS 和基因流的研究较少,而林下灌木类型研究更少。淡黄金花茶(*Camellia flavida* Chang)是一种具有淡黄色花瓣的金花茶植物,属于喀斯特典型的常绿耐阴灌木。它分布狭窄、零散,生境片段化,常生长于海拔 100—500 m 的较荫蔽的沟谷林下或灌丛中[25]。种子为蒴果,主要依赖重力传播,花粉主要为昆虫传粉。本文以喀斯特地区的耐阴灌木淡黄金花茶为研究对象,基于广西弄岗北热带喀斯特季节性雨林 15 hm^2(300 m × 500 m)监测样地,利用微卫星(SSR)标记,探讨以下问题:(1)淡黄金花茶的 SGS 强度如何?(2)淡黄金花茶具有怎样的基因流样式?(3)喀斯特强烈的生境异质性对淡黄金花茶的 SGS、基因流和遗传分化有着怎样的影响?

1 材料和方法

1.1 研究样地

广西弄岗北热带喀斯特季节性雨林 15 hm^2(300 m × 500 m)监测样地(以下简称 15 hm^2 样地)是由广西植物研究所于广西弄岗自然保护区建立,是中国森林生物多样性监测网络(Chinese Forest Biodiversity Monitoring Network, CForBio)和全球森林生物多样性监测网络(Center for Tropical Forest Science, CTFS)重要组成部分,也是唯一监测热带喀斯特森林的固定样地[26]。该样地包括了从山顶、山坡到洼地等一系列“峰丛-洼地”典型的桂西南喀斯特地区生境类型[2,26]。山顶岩石裸露度高,气候干热;样地中间包含一个洼地,伴有季节性水淹,气候阴湿,土层也较厚,其中还密生很多藤本植物,再加上四面坡地植被对其郁闭的影响,使得其小生境与四面坡地也有很大的差异[2,27]。15 hm^2 样地是依据全球森林生物多样性监测网络(CTFS)固定样地建设技术规范,测量并记录样地内胸径≥1 cm 的木本物种名称、胸径、高度、生长状态及坐标等信息[28]。该样地内的洼地周围聚集分布了 1 个淡黄金花茶种群,同时在样地周围分布有因生境异质性而呈间断分布的数个淡黄金花茶种群,该样地在喀斯特森林群落、生境类型和淡黄金花茶的分布上都具有代表性。因此,选用于研究喀斯特生境异质性对淡黄金花茶的精细空间遗传结构、基因流的影响。

1.2 调查和取样方法

对 15 hm^2 样地内所有的淡黄金花茶个体进行调查和采样,每株取 2—3 片幼叶,撕成<2 cm^2碎片,放入含有变色干燥硅胶的封口袋中干燥,带回实验室提取 DNA。胸径≥1 cm 的淡黄金花茶个体的坐标依据全球森林生物多样性监测网络(CTFS)固定样地建设技术规范精确测量,由广西植物研究所李先琨研究组提供,而胸

径<1 cm 的个体坐标通过测量与附近 3 株已知坐标植株的距离,经过几何运算获得精确坐标。根据是否达到开花年龄将淡黄金花茶分为 3 个年龄阶段:幼苗(基径≤1 cm,均未达到开花年龄)、幼树(1 cm<基径<2.5 cm,部分达到开花年龄)和成年树(基径≥2.5 cm,均达到开花年龄)。

1.3　DNA 提取和 SSR 分型

植物 DNA 的提取采取改良后的 CTAB 法[29]。根据已发表的 38 对淡黄金花茶[30]和 21 对近缘种平果金花茶(*Camellia pingguoensis*)[31]共 59 对 SSR 引物,利用 10 个淡黄金花茶个体作为测试样品进行 PCR 扩增,6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分型,筛选出 13 对扩增条带清晰、多态性高的 SSR 引物(表 1)。PCR 体系和程序参考 Lu 等[31]。

1.4　数据分析

1.4.1　遗传多样性

SSR 位点利用在线软件 Genepop on the Web[32]检测 Hardy-Weinberg 平衡,Micro-Checker v2.2.3 软件[33]检测是否存在零位点(null gene),GenAlEx 6 软件[34]统计等位基因(A)、观测杂合度(H_O)、期望杂合度(H_E)和固定系数(F_{IS})。

1.4.2　空间遗传结构

利用 SPAGeDi 软件[35]中的 Loiselle 等[9]的亲缘系数(kinship coefficient, F_{ij})统计淡黄金花茶的空间遗传结构(SGS)。参数设置如下:距离级(distance class)为 10 m,1000 次模拟统计 F_{ij} 标准差和 95%置信区间。空间遗传结构强度利用 Sp 统计,$Sp = -b_F/(1-F_1)$,b_F 为 F_{ij} 对距离自然对数的斜率,F_1 为第一距离级的亲缘系数[36]。

1.4.3　小尺度范围的遗传分化

以分布在广西自然弄岗保护区 15 hm² 样地种群 NG(144 株),CS(219 株), PA(35 株)和 PB(62 株)共 4 个种群(种群间距离 0.296 — 0.982 km,平均 0.627 km),研究淡黄金花茶在喀斯特地貌小尺度范围内(种群间距离<1 km)的遗传分化(图 1)。利用 GenAlEx 6.5 软件计算种群之间的遗传分化系数(F_{ST})和基因流(N_m),设置 999 模拟计算检测显著度。然后利用 STRUCTURE v2.2 软件[37]研究种群的遗传结构,参数设置为:Burn-in 100000 次,Markov's chain Monte Carlo (MCMC) 500000 迭代,重复 20 次,分组数目 K=1—5。运行结果压缩后利用在线软件 Struture harvester[38]分析,得出最佳遗传学种群数 K[39]。



图 1　小尺度范围的 4 个淡黄金花茶种群卫星分布图

Fig.1　The satellite imagery of four populations of *C. flavida* at small scale

1.4.4　种子流和花粉流

以 15 hm² 样地的幼苗为子代,幼树和成年树为亲本,利用 CERVUS 3.07 软件[40]进行亲本分析。CERVUS 3.07 软件是基于最大似然法进行亲本分析,通过估计子代和亲本之间的似然值的对数(LOD)[41],最高者为真实亲本,并且通过模拟计算临界值(LOD)判断其显著性。在双亲性别未知的亲本分析中,具有最高且显著的子代-双亲三联 LOD 值为最优双亲组合。亲本分析模拟参数设置为:子代数量为 21,候选双亲为 123,候选亲本为比例为 0.9,位点错配率为 0.01,置信度水平为 80%。根据 Dow 和 Ashley[42]的方法以及淡黄金花茶的种子主要依赖重力的传播特性,进行两个假设:(1)如果三联 LOD 值显著,即找到双亲,其中与子代较近的为母本,较远的为父本;(2)如果三联 LOD 值不显著,只有一个亲本 LOD 显著,那就认为该亲本为母本。然后根据子代、母本和父本的坐标绘制花粉流和种子流传播样式图,并根据 GenAlEx 6.05 软件[34]计算花粉和种子传播距离。

2 结果

2.1 空间分布

15 hm^2 样地分布淡黄金花茶 144 株,其中幼苗、幼树和成年树分别为 21、48 和 75 株,聚集分布在洼地周围约 3 hm^2(100 m×300 m)的区域,且被物种密度较大和伴有季节性水淹的洼地较明显地分为两个斑块 NG1 和 NG2 (图 2)。此外,样地外周围无淡黄金花茶分布,为相对孤立的种群。

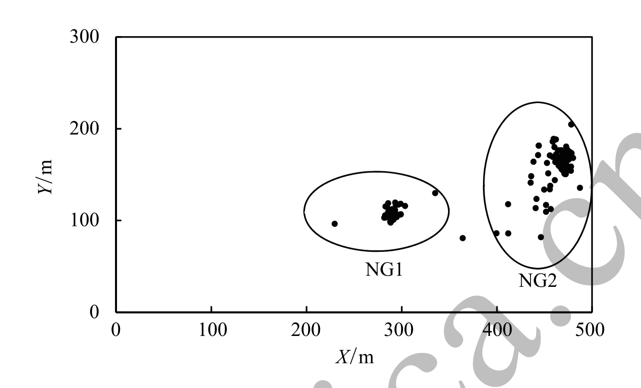


图 2 15 hm^2 样地淡黄金花茶分布图

Fig.2 Distribution of *C. flavdia* in 15 hm^2 plot

两个椭圆表示该样地的两个淡黄金花茶斑块 NG1 和 NG2

2.2 遗传多样性

利用扩增条带清晰、多态性高的 13 对 SSR 引物对 15 hm^2 样地的 144 株个体进行扩增,等位基因(A)、观测杂合度(H_O)、期望杂合度(H_E)和固定系数(F_{IS})分别为 7.23,0.748,0.729 和-0.027 (表 1)。经在线软件 Genepop on the web 检测,Bonferroni 矫正后只有引物 FLA9 显著偏离哈迪温伯格平衡(表 1),Micro-Checker 检测 13 对引物均不存在零位点。这表明这 13 对 SSR 引物具有较高的多态性和可靠性。

表 1 15 hm^2 样地淡黄金花茶的遗传多样性

Table 1 Genetic diversity of *C. flavida* in 15 hm^2 plot

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5′-3′)	退火温度 Ta (℃)	等位基因 A	实际杂合度 H_O	期望杂合度 H_E	固定系数 F_{IS}	哈迪温伯格平衡检测(P 值) HWET (P value)
TER4	TGAACAACAGCGAAAAACCG TTCTCAGCCGAAGCGACAAC	54	10	0.708	0.708	-0.001	0.9247
TER7	CAATAACGCAACAACAGATC ATGCTACTCCCACAGACAAC	52	5	0.694	0.678	-0.024	0.2762
TER12	CATCTCTCAAAAGACCCAGT AATGCGAGGAGAGGAGTTAT	54	9	0.813	0.768	-0.058	0.1104
TER21	CTCATTTCCCATCAATACAC TTCTTACATTCTCGTCCCTA	52	8	0.778	0.769	-0.012	0.3577
FLA4	TCTTATTGGGCCACACTAAACAT CCAGCCATATCACGACTTTTAGA	58	4	0.785	0.734	-0.070	0.8550
FLA8	TTCGGTTTGTATGTGTGAGAGTG TACGACCCTTCAAAAACTCTCCT	59	7	0.715	0.693	-0.032	0.0204
FLA9	TCCTTTGAAGCATTCACAAAAAT TACTTTGCAATTCAGCTTGAGGT	58	13	0.868	0.861	-0.008	0.0021 *
FLA12	GAAGTCTCAGAAGAAGCAAACGA CATATGCTCGCTAAAACCTTCAG	58	4	0.611	0.599	-0.020	0.8749
FLA17	GCTTTCTGAGACCGATTAAGTGA GCATATTGCCCCATTTAGGTATT	58	4	0.743	0.694	-0.070	0.1534
FLA26	TAACCAGGTCAGGTGTCAGCTAT CAAGAGTTGGGAAAGGAAAGTCT	58	7	0.681	0.665	-0.024	0.0536
FLA27	TGAGGTTTAATCGAAAAACCAAG GTACCTTCTTCTTCCTTCTGGGA	58	7	0.840	0.813	-0.034	0.0211
FLA31	GATGGAGGAGAAAATGGGTACAT GACGCGTTAATGAAGGTTACAAG	58	10	0.785	0.764	-0.027	0.0299
FLA36	TGCTGAGCGTAGTATGAGATGAA CTCCTCTCCACTCCTTGTCTCTT	58	6	0.708	0.727	0.025	0.0127
平均			7.23	0.748	0.729	-0.027	

A, alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient; HWET, Hardy-Weinberg equilibrium test; *, 经过 Bonferroni 矫正后显著偏离哈迪温伯格平衡

2.3　空间遗传结构

淡黄金花茶个体间的亲缘系数(F_{ij})在 50 m 范围内存在显著正相关,50—130 m 处于显著或者不显著的波动状态,而 130—220 m 处于显著负相关(图 3)。在第一距离级 10 m,F_{ij}为 0.0521,略小于第一表兄弟(the first cousin)的 F_{ij}(0.0625),SGS 强度 Sp 为 0.0248。

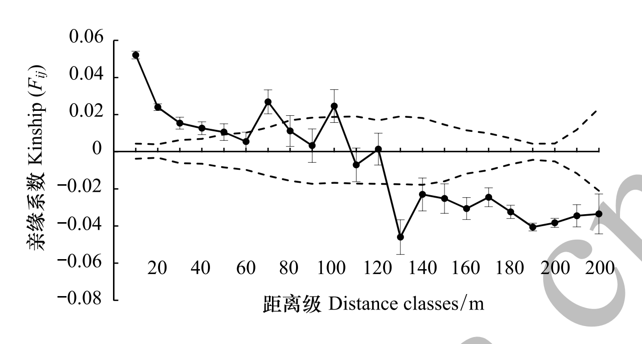


图 3　淡黄金花茶的精细空间遗传结构

Fig.3　Fine-scale spatial genetic structure of *C. flavida*

实线表示亲缘系数,虚线表示 95%置信区间

2.4　小尺度范围的遗传分化

一般而言,种群的 SGS 在某个距离范围后不会一直都表现出明显的负相关,但是 15 hm^2 样地淡黄金花茶的 SGS 在 130 m 后(130—220 m)均产生了明显的负相关(图 3),我们推测是由于该种群的 100 m 的两个斑块之间存在显著的遗传分化导致的。F 统计表明,NG1 和 NG2 两个斑块之间存在显著的遗传分化(F_{ST}=0.079,$P < 0.05$)。STRUCTURE 结果表明,该种群的最佳遗传学种群分组 K=2,STRUCTURE 聚类图显示两个斑块的遗传结构存在一定的遗传分化(图 4)。所以,F 统计和 STRUCTURE 均证明 15 hm^2 样地两个淡黄金花茶斑块间存在显著的遗传分化,导致 SGS 在 130—220 m 产生显著负相关。

此外,喀斯特地貌小尺度范围内(种群间距离<1 km)4 个淡黄金花茶种群间均发生了显著的遗传分化(P<0.05),遗传分化系数 F_{ST}为 0.099—0.133,平均为 0.116;基因流为 1.632—2.285,平均为 1.939(表 2)。

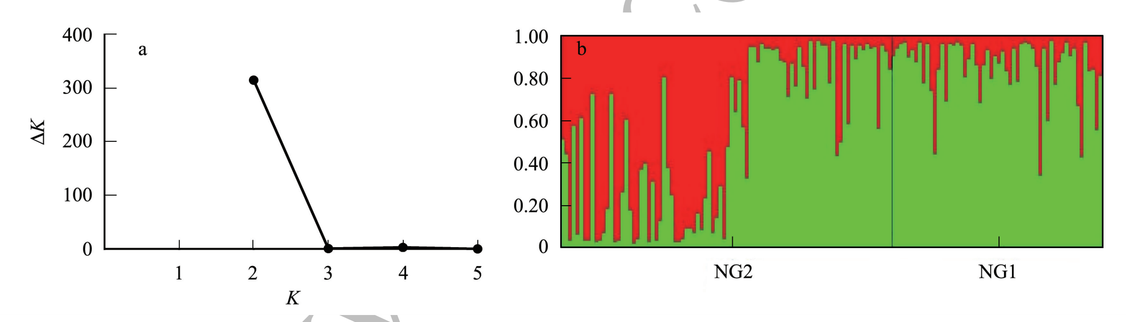


图 4　15 hm^2样地 NG1 和 NG2 两个斑块的 STRUCTURE 分析

Fig.4　The STRUCTURE analysis of NG1 and NG2 patches in 15 hm^2 plot

(a):K=1—5 时,K 与 ΔK 的关系图;(b):K=2 时,两个斑块的 STRUCTURE 聚类图

表 2　小尺度范围淡黄金花茶种群间的遗传分化系数 F_{ST}和基因流 N_m

Table 2　Genetic differentiation coefficient F_{ST} and gene flow N_m among populations of *C. flavia* at small scale

	NG	*CS*	*PA*	*PB*		NG	CS	PA	PB
NG	–	2.161	1.679	1.632	PA	0.130 *	0.105 *	–	1.754
CS	0.104 *	–	2.120	2.285	PB	0.133 *	0.099 *	0.125 *	–

下对角线为遗传分化系数 F_{ST},上对角线为基因流 Nm;“ * ”表示产生显著的遗传分化($P < 0.05$)

2.5　种子流和花粉流

15 hm^2 样地淡黄金花茶幼苗的亲本分析表明,在三联置信度 80%水平下,21 株幼苗中 18 株(85.7%)找到双亲,3 株(14.3%)只找到单亲(表 3)。换而言之,18 株幼苗的花粉来源于样地内,3 株可能来源样地外。这说明 15 hm^2 样地的幼苗的花粉大部分来源样地内,较少来源于样地外。

通过亲本分析发现,子代存在的同胞和半同胞只占所有幼苗的 33.3%。例如,同胞个体 NG90 和 NG91 均来源与双亲 NG89 和 NG105;同母异父的半同胞 NG109、NG111 和 NG121 均来源与母本 NG98 (表 4)。根据幼苗、父本和母本的坐标计算出种子传播距离为 0.65—51.05 m,平均 12.47 m;花粉传播的距离为 3.06—

194.73 m,平均 29.03 m (表 4)。以 10 m 为距离级,统计每个距离级淡黄金花茶的花粉和种子传播频率,结果表明花粉和种子的传播距离均主要是在 20 m 范围内,所占比例分别为 72.2%和 81.0%(图 5)。

表 3 15 hm^2 样地幼苗双亲分析

Table 3 Parentage analysis of seedlings in 15 hm^2 plot

子代 (O)	第一亲本 (FC)	错配位点数 (PLM)	LOD 值 (PLS)	成对置信度 (PC)	第二亲本 (SC)	错配位点数 (PLM)	LOD 值 (PLS)	成对置信度 (PC)	三联位点错配数 (TLM)	三联 LOD 值 (TLS)	三联置信度 (TC)
NG3	NG32	0	5.92	*	NG137	0	3.73	*	0	12.23	*
NG83	NG115	1	0.88	-	NG103	0	3.89	*	1	7.59	*
NG84	NG108	1	-0.88	-	NG94	0	5.36	-	1	7.46	*
NG90	NG89	0	5.44	*	NG105	0	8.54	*	0	17.21	*
NG91	NG89	0	4.84	*	NG105	0	7.09	*	0	15.74	*
NG111	NG98	1	3.95	*	NG95	1	1.36	-	1	10.20	*
NG120#	NG80	2	-5.84	-	NG104	0	4.89	*	3	-1.48	-
NG121	NG102	0	6.53	-	NG108	1	2.43	-	1	10.21	*
NG122	NG98	0	7.73	*	NG103	0	1.49	-	0	15.05	*
NG132#	NG134	1	1.54	*	NG115	1	-2.46	-	2	2.51	-
NG140	NG71	1	-2.11	-	NG15	1	2.45	*	1	5.35	*
NG37	NG130	1	4.09	*	NG57	0	10.18	*	1	12.10	*
NG77	NG70	0	2.87	-	NG31	0	7.22	-	0	13.22	*
NG86	NG114	0	14.20	*	NG117	1	8.43	*	1	17.88	*
NG88	NG110	0	4.22	-	NG82	0	7.50	*	0	14.79	*
NG40	NG23	0	4.98	*	NG69	1	0.23	-	1	8.61	*
NG48#	NG51	1	2.40	*	NG65	1	-2.22	-	3	0.30	-
NG50	NG51	0	8.03	*	NG34	0	9.90	*	0	21.31	*
NG81	NG112	1	1.96	-	NG97	0	8.67	*	1	10.83	*
NG109	NG98	0	6.09	*	NG20	1	0.13	-	2	7.43	*
NG119	NG99	0	5.93	-	NG87	0	7.84	-	0	14.90	*

O, Offsprings; FC, First candidate; PLM, Pair loci mismatching; PLS, Pair LOD score; PC, Pair confidence; SC, Second candidate; TLM, Trio loci mismatching;TLS, Trio LOD score; TC, Trio confidence; “*”和“-”分别表示在 80%置信度下显著和不显著,“#”表示该幼苗只找到单亲

表 4 淡黄金花茶种子和花粉传播距离

Table 4 The seed and pollen dispersal distance of *C. flavida*

编号 Numbers	子代 Offsprings	母本 Mothers	父本 Fathers	种子传播距离/m Seed dispersal distance	花粉传播距离/m Pollen dispersal distance
1	NG3	NG32	NG137	33.41	106.85
2	NG83	NG103	NG115	11.92	16.99
3	NG84	NG108	NG94	6.66	5.57
4	NG90	NG89	NG105	1.50	9.46
5	NG91	NG89	NG105	1.40	9.46
6	NG111	NG98	NG95	6.26	4.60
7	NG120	NG104	—	23.05	—
8	NG121	NG108	NG102	13.12	6.89
9	NG122	NG98	NG103	12.72	7.80
10	NG132	NG134	—	43.49	—
11	NG140	NG71	NG15	16.94	42.27
12	NG37	NG130	NG57	0.65	17.97
13	NG77	NG31	NG70	6.22	27.53
14	NG86	NG117	NG114	5.88	5.88

续表

编号 Numbers	子代 Offsprings	母本 Mothers	父本 Fathers	种子传播距离/m Seed dispersal distance	花粉传播距离/m Pollen dispersal distance
15	NG88	NG110	NG82	4.17	4.57
16	NG40	NG23	NG69	8.82	38.03
17	NG48	NG51	—	4.14	—
18	NG50	NG51	NG34	2.25	14.73
19	NG81	NG97	NG112	51.05	3.06
20	NG109	NG98	NG20	3.60	194.73
21	NG119	NG99	NG87	4.53	6.14
			平均 Average	12.47	29.03

"—"表示没有找到父本

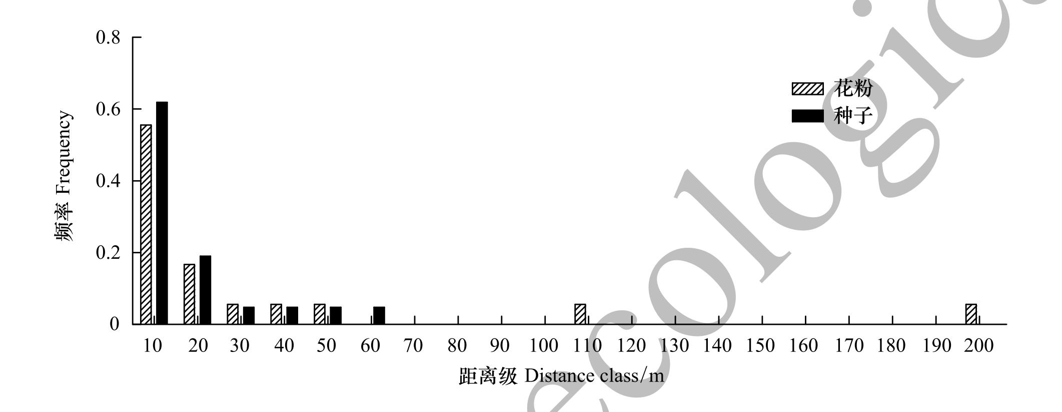


图 5　淡黄金花茶在每个距离级花粉和种子传播频率

Fig.5　The pollen and seed dispersal frequency of *C. flavida* within distance classes

此外,分别对两个斑块 NG1 和 NG2 幼苗的父本来源进行分析发现,除了斑块 NG1 的仅有 1 株幼苗的父本来源于斑块 NG2,斑块 NG1 幼苗的父本均来源于斑块 NG1 内,斑块 NG2 幼苗的父本均来源于斑块 NG2 内(图 6)。这表明淡黄金花茶的花粉流几乎均存在于斑块内,而较少存在于斑块之间。

3　讨论

3.1　空间遗传结构(SGS)

影响 SGS 的两个主要因素是种子流和花粉流[22-24]。当存在较强的花粉流时,往往产生较弱的或者不具有显著的 SGS,如风媒传粉植物板栗和锥栗[43]、青冈[44]、巴西松[45]等;当花粉和种子高度局域传播时将会产生近交,同胞聚集母树周围而导致较强的 SGS[24],如虫媒传粉、依靠种子传播的植物野生大豆[46]、黄梅秤锤树[47]、黑檀[11]等。淡黄金花茶主要依靠昆虫传粉,种子依赖重力传播,且具有生境偏好性,故推测淡黄金花茶具有较强的 SGS。研究结果表明,淡黄金花茶存在显著的 SGS 的距离为 50 m,第一距离级 10 m 范围内的亲缘系数 F_1 为 0.0521,*Sp* 为 0.0248,显示较强的 SGS,与预测的结果一致。双亲分析表明,淡黄金花茶种子和花粉传播距离较短,平均距离分别为 12.47 m 和 29.03 m,72.2%的花粉和 81.0%的种子的传播距离在 20 m 范围内。所以,有限的花粉和种子传播距离导致淡黄金花茶具有较强的 SGS。

与同属植物山茶(*C. japonica*)比较,Ueno 等[48]利用 SSR 研究在 4 hm^2 样地中发现山茶只有 5 m 范围内存在较弱的 SGS,Chung 等[19]利用同工酶研究 1 hm^2 样地的山茶(*C. japonica*)发现存在显著 SGS 的距离为 21 m,在第一距离 7 m 范围内 F_1 为 0.02。这表明淡黄金花茶产生显著 SGS 的距离和强度均明显大于山茶。然而,淡黄金花茶的 *Sp* 与 He 等[49]研究的中国西南喀斯特专有乔木掌叶木(*Handeliodendron bodinieri*)的 *Sp* 为 0.0233的结果相似,同时与 Vekman 和 Hardy[36]总结的 6 种灌木的 *Sp* (0.0259)和 6 种种子依赖重力传播的物

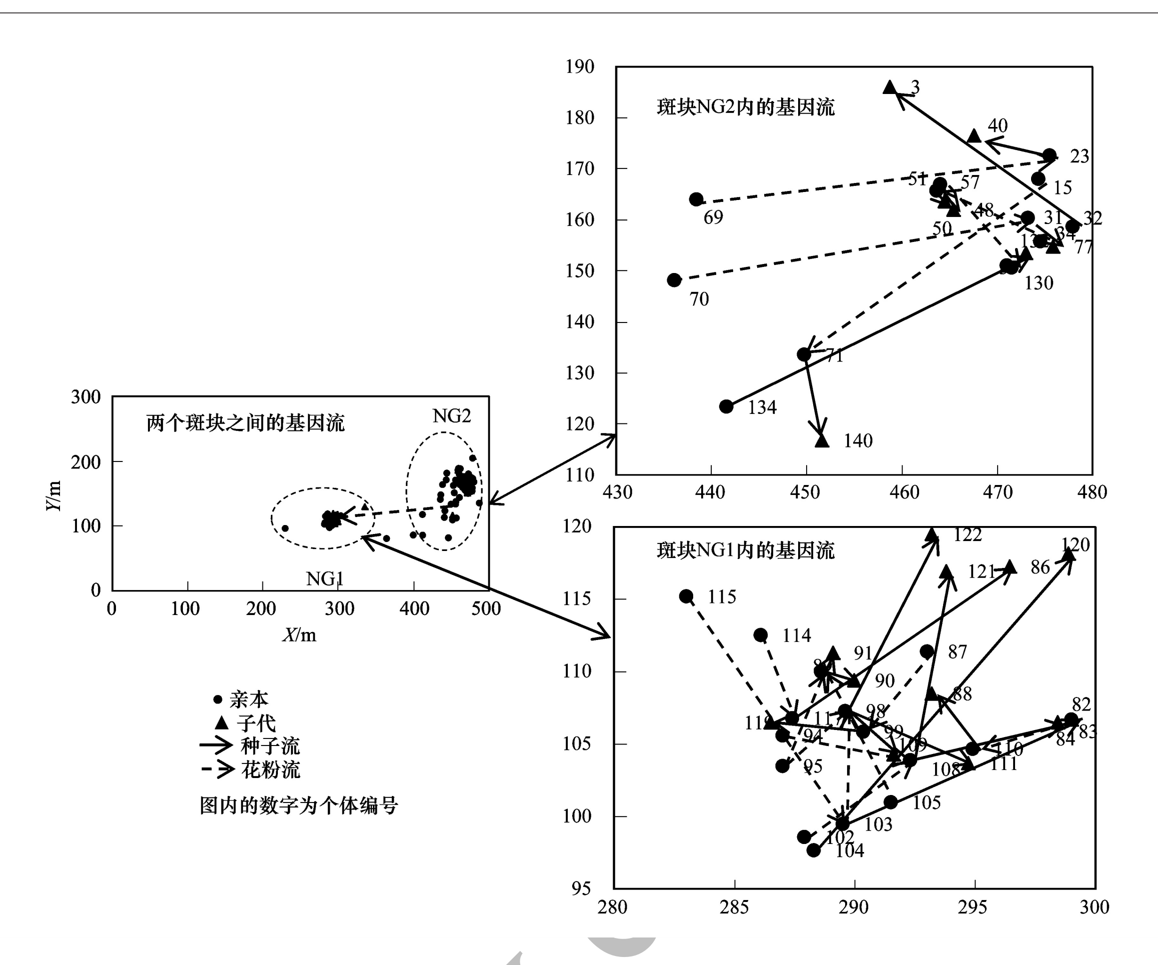


图 6 15 hm^2 样地淡黄金花茶的种子流和花粉流

Fig.6 The seed and pollen flow of *C. flavida* in 15 hm^2 plot.

(a):两个斑块之间的基因流;(b):斑块 NG2 内的基因流;(c):斑块 NG1 内的基因流

种的 *Sp* (0.0281)相似。这表明淡黄金花茶在灌木类型和依赖种子传播的物种中具有中等程度的 SGS。

3.2 小尺度范围的种群遗传分化

典型的喀斯特地貌具有空间、土壤和水分等强烈的异质性,植物对喀斯特地貌特殊且丰富的小生境及其配置格局具有明显的适应性[50]。研究物种在喀斯特地区小尺度范围内的遗传分化有助于了解物种对喀斯特地区的适应和喀斯特专有种丰富的原因。本研究发现喀斯特地区的淡黄金花茶在 15 hm^2 样地被洼地隔离、相距只有 100 m 的两个斑块之间产生了较小但显著的遗传分化(F_{ST} = 0.079,P < 0.05),在小尺度范围(种群距离<1 km)的 4 个淡黄金花茶种群产生了中等而显著的遗传分化(F_{ST} =0.116, P < 0.05)。这表明在小尺度范围喀斯特生境对淡黄金花茶的遗传分化产生显著影响。

Linhart 和 Grant[52] 总结了小尺度范围物种的遗传分化规律,发现木本植物在 100—300 m 产生遗传分化,生境的异质性产生遗传的异质性,基因流和自然选择对遗传分化产生强烈的影响。同时,Gao 等[53] 研究表明,中国南方喀斯特地貌的苦苣苔科牛耳朵(*Primulina eburnea*)复合群的遗传分化同样是由于遗传漂变和较少的基因流导致。淡黄金花茶在小尺度产生遗传分化也符合这样的规律。首先,喀斯特地区生境异质性强烈和淡黄金花茶具有生境偏好性导致其分布片段化,一定程度减弱种群的基因交流。本研究发现 15 hm^2 样地内被单个洼地隔离、相距只有 100 m 的两个淡黄金花茶斑块之间的花粉流大部分存在于斑块内,而较少存在于斑块间。这是由于两个斑块之间为洼地的小生境与四面坡地存在很大差异,洼地在雨季常有雨水浸泡,密生藤本,种群密度大[27],一方面这不利于淡黄金花茶种子的萌发和幼苗的生长,两个斑块不能形成重叠区;另一方面有效阻止了两个斑块之间的花粉传播。其次,15 hm^2 样地两个淡黄金花茶斑块所处的坡向、光照条件

和植被类型等不同,存在生境异质性,也会产生不同的自然选择压力,从而产生遗传分化。单个洼地对淡黄金花茶的基因流产生了阻碍作用,那么小尺度范围(种群距离<1 km)的种群间包含多个峰丛和洼地,自然对基因流会产生更为显著的影响,从而导致产生更大的遗传分化。所以,喀斯特生境的异质性和淡黄金花茶生境的偏好性导致淡黄金花茶在喀斯特生境小尺度范围产生了遗传分化。

3.3　花粉流和种子流

种子流和花粉流是种群最基本而最重要的生态过程,决定物种的遗传多样性、进化与适应性。喀斯特地区植物具有怎样的花粉传播模式,以及典型的喀斯特峰丛对花粉传播具有怎样的影响是值得研究的问题。目前,在植物花粉流的研究中,越来越多结果表明花粉传播距离比想象中更远[54-55]。例如许多热带乔木花粉传播距大部分达几百米至几公里[54],喀斯特地区乔木掌叶木(*Handeliodendron bodinieri*)的花粉传播距离可达786—1400 m[49]。然而,喀斯特地区的淡黄金花茶种子和花粉传播距离较短,平均距离分别只有为12.47 m和29.03 m。同时,15 hm^2 样地的两个斑块和小尺度范围的4个淡黄金花茶种群间产生了显著遗传分化,种群间具有较少的基因流。这均表明喀斯特地貌对淡黄金花茶的基因流具有阻碍作用。这可能是在乔木层,传粉者受到的阻碍较少,更容易发现远处的花朵,但林下灌木的淡黄金花茶,其生长在物种丰富、生境异质性强烈的喀斯特地貌,传粉者不易于发现距离较远花朵,导致传粉仅限于非常小的范围。其次,淡黄金花茶具有较强的生境的偏好性,呈片段化不连续分布,使得种群之间的基因流较少。综上所述,喀斯特地貌对淡黄金花茶的基因流具有阻碍作用,可能由于强烈的喀斯特生境异质性、淡黄金花茶的灌木特性和生境偏好导致。

4　结论

典型的喀斯特生境异质性是否对耐阴灌木的基因流存在影响鲜有人研究。本研究发现,与乔木具有较远的花粉传播距离不同,喀斯特地区典型耐阴灌木淡黄金花茶的花粉和种子传播距离较短,导致在小尺度范围甚至在100 m的距离产生了显著的遗传分化,这说明喀斯特生境异质性对淡黄金花茶的基因流产生显著的影响。同时,淡黄金花茶的灌木特性和生境的偏好性与基因流存在密切关系。

致谢:广西植物研究所李先琨研究组提供15 hm^2 样地淡黄金花茶坐标信息,广西弄岗自然保护区和广西植物研究所何运林、李东兴、郭屹立和王斌帮助采样,特此致谢。

参考文献(References):

[1] 李先琨, 何成新. 西部开发与热带亚热带岩溶脆弱生态系统恢复重建. 农业系统科学与综合研究, 2002, 18(1): 13-16.

[2] 黄甫昭, 丁涛, 李先琨, 郭屹立, 王斌, 向悟生, 文淑均, 李冬兴, 何运林. 弄岗喀斯特季节性雨林不同群丛物种多样性随海拔的变化. 生态学报, 2016, 36(14): 4509-4517.

[3] 朱华. 中国南方石灰岩(喀斯特)生态系统及生物多样性特征. 热带林业, 2007, 35(S1): 46-47.

[4] 吴望辉. 广西弄岗国家级自然保护区植物区系地理学研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2011.

[5] 苏志尧, 张宏达. 广西植物区系的特有现象. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(1): 1-9.

[6] 梁畴芬, 梁健英, 刘兰芳, 莫新礼. 岗植物区系考察报告. 广西植物, 1985, 5(3): 191-209.

[7] 袁道先, 章程. 岩溶动力学的理论探索与实践. 地球学报, 2008, 29(3): 355-365.

[8] Epperson B K, Allard R W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. Genetics, 1989, 121(2): 369-377.

[9] Loiselle B, Sork V L, Nason J D, Graham C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). American Journal of Botany, 1995, 82(11): 1420-1425.

[10] Baldauf C, Ciampi-Guillardi M, Aguirra T J, Corrêa C E, Maës dos Santos F A, de Souza A P, Sebbenn A M. Genetic diversity, spatial genetic structure and realised seed and pollen dispersal of *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) in the Brazilian savanna. Conservation Genetics, 2014, 15(5): 1073-1083.

[11] Leite F A B, Brandão R L, de Oliveira Buzatti R S, de Lemos-Filho J S, Lovato M B. Fine-scale genetic structure of the threatened rosewood *Dalbergia nigra* from the Atlantic Forest——comparing saplings versus adults and small fragment versus continuous forest. Tree Genetics &

Genomes, 2014, 10(2): 307-316.
[12] Ng K K S, Lee S L, Koh C L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. Molecular Ecology, 2004, 13(3): 657-669.
[13] Sagnard F, Oddou-Muratorio S, Pichot C, Vendramin G G, Fady B. Effects of seed dispersal, adult tree and seedling density on the spatial genetic structure of regeneration at fine temporal and spatial scales. Tree Genetics & Genomes, 2011, 7(1): 37-48.
[14] González-Martínez S, Gerber S, Cervera M, Martínez-Zapater J, Gil L, Alía R. Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(8): 1290-1297.
[15] Jacquemyn H, Brys R, Vandepitte K, Katrien V, Honnay O, Roldán-Ruiz I. Fine-scale genetic structure of life history stages in the food-deceptive orchid *Orchis purpurea*. Molecular Ecology, 2006, 15(10): 2801-2808.
[16] Jones A F, Hubbell P S. Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. Molecular Ecology, 2006, 15(11): 3205-3217.
[17] Jones T H, Vaillancourt R E, Potts B M. Detection and visualization of spatial genetic structure in continuous *Eucalyptus globulus* forest. Molecular Ecology, 2007, 16(4): 697-707.
[18] Hardesty B D, Dick C W, Hubbell A, Kremer S, Bermingham E. Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. Heredity, 2005, 95(4): 290-297.
[19] Chung M Y, Epperson B K, Chung M G. Genetic structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae). Evolution, 2003, 57(1): 62-73.
[20] de Almeida Vieira F, Fajardo C G, de Souza A M, Reis C A F, de Carvalho D. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. Tree Genetics & Genomes, 2012, 8(6): 1191-1201.
[21] Chung M Y. Variation in demographic and fine-scale genetic structure with population-history stage of *Hemerocallis taeanensis* (Liliaceae) across the landscape. Ecological Research, 2008, 23(1): 83-90.
[22] Ennos R A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. Heredity, 1994, 72(3): 250-259.
[23] Wright S. Isolation by distance. Genetics, 1994, 28(2): 114-238.
[24] Kalisz S, Nason J D, Hanzawa M F, Tonsor S J. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*——the roles of dispersal, mating, history, and selection. Evolution, 2001, 55(8): 1560-1568.
[25] Min T L, Bartholomew B. Theaceae//Wu Z Y, Raven P H, Hong D Y. Flora of China. Beijing, St. Louis: Science Press, Missouri Botanical Garden Press, 2006: 371-371.
[26] 王斌, 黄俞淞, 李先琨, 向悟生, 丁涛, 黄甫昭, 陆树华, 韩文衡, 文淑均, 何兰军. 弄岗北热带喀斯特季节性雨林 15ha 监测样地的树种组成与空间分布. 生物多样性, 2014, 22(2): 141-156.
[27] 黄俞淞. 弄岗自然保护区重要森林物种资源监测样地植物物种多样性研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2010.
[28] 何兰军. 广西弄岗北热带喀斯特季节性雨林种群空间格局研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2012.
[29] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
[30] Liufu Y Q, Peng G Q, Lu Y B, Ye Q Q, Tang S Q. Development and characterization of 38 microsatellite markers for *Camellia flavida* based on transcriptome sequencing. Conservation Genetics Resources, 2014, 6(4): 1007-1010.
[31] Lu Y B, Liufu Y Q, Peng G Q, Ye Q Q, Tang S Q. Development of 21 microsatellite primers for *Camellia pingguoensis* (Theaceae) using 454 sequencing. Conservation Genetics Resources, 2014, 6(3): 791-793.
[32] Rousset F. genepop'007——a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(1): 103-106.
[33] van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M, Shipley P. Micro-checker——software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3): 535-538.
[34] Peakall R, Smouse P E. GENALEX 6——genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288-295.
[35] Hardy O J, Vekemans X. SPAGeDi——a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Molecular Ecology Notes, 2002, 2(4): 618-620.
[36] Vekemans X, Hardy O J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. Molecular Ecology, 2004, 13(4): 921-935.
[37] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data——dominant markers and null alleles. Molecular Ecology Resources, 2007, 7(4): 574-578.
[38] Earl D A, von Holdt B M. STRUCTURE HARVESTER——a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources, 2012, 4(2): 359-361.

[39] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE——a simulation study. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.

[40] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099-1106.

[41] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, Pemberton J M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 1998, 7(5): 639-655.

[42] Dow B D, Ashley M V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. Molecular Ecology, 1996, 5(5): 615-627.

[43] 朱蕾, 康明. 板栗和锥栗同域居群的空间遗传结构. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(1): 1-7.

[44] 陈小勇. 安徽黄山青冈种群遗传结构的空间自相关分析. 植物生态学报, 2001, 25(1): 29-34.

[45] Sant'Anna C S, Sebbenn A M, Klabunde G H F, Bittencourt R, Nodari R O, Mantovani A, dos Ries M S. Realized pollen and seed dispersal within a continuous population of the dioecious coniferous Brazilian pine [*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze]. Conservation Genetics, 2013, 14(3): 601-613.

[46] 朱维岳, 周桃英, 钟明, 卢宝荣. 基于遗传多样性和空间遗传结构的野生大豆居群采样策略. 复旦学报: 自然科学版, 2006, 45(3): 321-327.

[47] 阮咏梅, 张金菊, 姚小洪, 叶其刚. 黄梅秤锤树孤立居群的遗传多样性及其小尺度空间遗传结构. 生物多样性, 2012, 20(4): 460-469.

[48] Ueno S, Tomaru N, Yoshimaru H, Manabe T, Yamamoto S. Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. Molecular Ecology, 2000, 9(6): 647-656.

[49] He R K, Wang J, Huang H W. Long-distance gene dispersal inferred from spatial genetic structure in *Handeliodendron bodinieri*, an endangered tree from karst forest in southwest China. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 44: 295-302.

[50] 郭柯, 刘长成, 董鸣. 我国西南喀斯特植物生态适应性与石漠化治理. 植物生态学报, 2011, 35(10): 991-999.

[51] 卢永彬. 淡黄金花茶种群遗传结构研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2015.

[52] Linhart Y B, Grant M C. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 1996, 27(1): 237-277.

[53] Gao Y, Ai B, Kong H H, Kang M, Huang H W. Geographical pattern of isolation and diversification in karst habitat islands——a case study in the *Primulina eburnea* complex. Journal of Biogeography, 2015, 42(11): 2131-2144.

[54] Dick C W, Hardy O J, Jones F A, Petit R J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. Tropical Plant Biology, 2008, 1(1): 20-33.

[55] Nason J D, Herre E A, Hamrick J L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. Nature, 1998, 391(6668): 685-687.